

安全性評価法(細胞系)の構築(II)

研究分担者 伊藤祥輔 藤田医科大学 医療科学部 名誉教授
研究協力者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 客員研究員

研究要旨:

白斑発症と強く相関する細胞応答の評価系確立を目指し、ロドデノール(RD)や構造類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通して認められる「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化」を、細胞・培地での代謝物解析により評価する方法を確立した。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用い、オルトキノン体グルタチン・システイン付加体の産生を HPLC 電気化学検出法により解析した。本法は、4-置換フェノール類に広範囲に応用でき、感度、特異性ともに優れた方法と言える。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症事象に関し、本分担研究においては、白斑発症と強く相関する細胞応答を探索し、その評価系を確立することを目的とした。

RD ならびに類似の 4-置換フェノール構造を有する白斑誘導性化合物は、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されることが報告されており、白斑発症において化合物のチロシナーゼによる代謝活性化の関与が強く示唆されてきた。そこで、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化を代謝物産生により評価する手法について検討を開始した。293T 細胞にヒトチロシナーゼを高発現させ、RD ならびに 4-S-システアミニルフェノール(4SCAP)の代謝を調べた。その結果、細胞・培地中のオルトキノン体をグルタチオン・システイン付加体として HPLC を用いて測定する手法について条件を確立した。引き続き、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生解析が、白斑誘導性ラズベリーケトン(RK)、モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)、4-tert-ブチルフェノール(4-TBP)、4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)、およ

び p-クレゾール(CRE)についても可能であることを示した。一方、4-置換フェノール構造を持たない、ルシノール(RUC)および 2-S-システアミニルフェノールは代謝を受けなかったことから、本法がチロシナーゼ依存性であることが証明された。

さらに、本法を用いての代謝活性化解析の汎用性を明らかにするために、白斑誘導性について報告は無いが、4-置換フェノール類であり、サプリメントとして広範に使用されているレスベラトロールおよびエクオールについても解析を行い、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生を確認した。

レスベラトロール(RES)のジメチル誘導体であるプテロスチルベン(PTS)が、RES 同様にサプリメントとして注目を集めている。令和5年度は、PTS のチロシナーゼによる代謝活性化について、RES との比較検討を行った。

最後に、チロシナーゼ依存性の代謝が明確でないヒドロキノン(HQ)について、同様に解析を行った。

B. 研究方法

293T 細胞にヒトチロシナーゼを一過性に発現させ、24 時間後に薬物処理を開始し、2 時間後の細胞および培地を回収した(研究協力者最上知子実施)。細胞および培地の代謝産物は既報 (Ito et al., *Pigment Cell Melanoma Res.*, 28, 295-306, 2015) に従い、HPLC 電気化学検出法により解析した。

C. 研究結果

1. PTS のチロシナーゼによる代謝

以前、我々は RES がチロシナーゼの基質となり、メラノサイトに対して高い細胞毒性を持つオルトキノン代謝物を生成することを報告した。今回、我々は PTS が RES と同様の代謝を受ける可能性について比較検討を行った。その結果、PTS はチロシナーゼ酸化によりオルトキノン体を形成し、*N*-アセチルシステインなどのチオール類と反応して付加体を形成した。また、ヒトチロシナーゼ発現細胞において、細胞内には PTS が RES よりも 8 倍多く取り込まれ、システインおよびグルタチオン付加体が 3 倍多く産生されることを確認した。加えて、B16BL6 細胞において、チロシナーゼ依存性の細胞毒性を示した。この結果は親油性基である PTS の二つのメチル基により膜透過性が向上して細胞内タンパクと結合しやすくなり、メラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性を示唆している。

2. HQ のチロシナーゼによる代謝

HQ に触媒量の L-ドーパの存在下、マッシュルームチロシナーゼを作用すると、ヒドロキシベンゾキノン (HHQ) の生成が認められた。すなわち、HQ はチロシナーゼの基質となり、カテコール体を生成した。一方、ヒトチロシナーゼを用いた場合、HHQ は生成しないことから、HQ はヒトチロシナーゼの直接の基質にはならないが、天然基質であるドーパの存在下、そのキノン体であるドーパキノンとの酸化還元反応により *p*-ベンゾキノンへと酸化されることを明らかにした。この系にシステインが存在すると、*p*-ベンゾキノン はシステインと結合し、システイニル-HQ を生成した(投稿準備中)。

D. 考察

RD や類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する「チロシナーゼによる代謝活性化」化を細胞で評価する方法の確立に向け、これまで、ヒトチロシナーゼを高発現した細胞を用いて代謝物解析を行う方法について検討を行ってきた。その結果、オルトキノン体のチオール付加体を HPLC 電気化学検出法により定量する分析法を確立した。本法は細胞生存率を用いる細胞毒性評価法に比べ、感度および特異性において優れている。

白斑誘導性 4-置換フェノール類がチロシナーゼにより代謝され生じるオルトキノンは、グルタチオンやシステインなどの細胞内 SH 基との反応性が高い。タンパク中の SH 基と反応すると、機能変化あるいは変成・修飾による抗原性の獲得が白斑誘導と関連する可能性が推定されるが、修飾タンパクの分析は困難である。そこで代替マーカーとして非タンパク性のシステイン、グルタチオン付加体の分析を検討してきた。これまでの研究において、ヒトチロシナーゼを高発現する 293T 細胞を用いる方法について条件検討を進め、RD ならびに白斑誘導性フェノール類 4SCAP, RK, MBEH, 4-TBP, 4SCAP, CRE の暴露により、オルトキノン代謝物のチオール付加体が検出可能であることを確認した。

昨年度は、本法の適用対象を広げ、白斑誘導能の報告は無いが、RD 同様に 4-置換フェノール構造を持つ EQ ならびに RES について検討を行った。その結果、いずれの化合物からもオルトキノン体のチオール付加体の産生を確認することができた。

令和 5 年度は、PTS の *in vitro* でのチロシナーゼによる代謝活性化について、ヒトチロシナーゼ強制発現 293 細胞を用いて、チオール付加体への代謝活性化を確認した。

さらに、HQ について、これまで明確でなかったチロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。

E. 結論

白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する代謝活性化の細胞での評価法の確立を受け、同様な4-置換フェノール構造を有し、RESのジメチル体であるPTSについてチロシナーゼによる代謝活性化を調べた。その結果、RES同様にPTSについてもメラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性が示唆された。

HQは色素沈着症の治療に汎用されている化合物であるが、まれに色素過形成(外因性ochronosis)を起こすことが知られている。しかし、その機序は明らかではない。今回、チロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。Ochronosis機序解明につながることを期待したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし